

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-169170

(43) 公開日 平成11年(1999) 6月29日

(51) Int.Cl.<sup>8</sup>

識別記号

F I

C 1 2 N 15/00  
1/00

C 1 2 N 15/00  
1/00

Z  
U

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平9-341066

(22) 出願日 平成9年(1997)12月11日

(71) 出願人 000003160

東洋紡績株式会社  
大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72) 発明者 鈴木 正宏

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株  
式会社敦賀バイオ研究所内

(72) 発明者 石田 由和

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株  
式会社敦賀バイオ研究所内

(72) 発明者 小松原 秀介

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株  
式会社敦賀バイオ研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物DNAの抽出精製方法

(57) 【要約】

【課題】 DNAを含む植物材料からDNAを煩雑な操作を必要とすることなく、短時間かつ高純度で抽出精製する方法を提供する。

【解決手段】 下記工程 (a) ~ (e) を含むことを特徴とする植物DNAの抽出精製方法およびそのための試薬。

(a) 植物材料に界面活性剤および必要によりタンパク変性剤を含む溶解液を混合して、植物材料中の細胞を溶解し、(b) 得られた細胞溶解液に界面活性剤を抽出する有機溶媒を加えて、混合した後、水相と有機溶媒相を分離し、(c) 得られた水相にカオトロピック物質を含む吸着液および核酸結合性固相担体を中性乃至弱アルカリ性条件下に混合させて、植物材料中の細胞に含まれるDNAを核酸結合性固相担体上に吸着させ、(d) DNAを吸着させた核酸結合性固相担体を洗浄液にて洗浄して、植物細胞中に含まれる糖類およびタンパク類を除去し、次いで、(e) 核酸結合性固相担体に結合したDNAを溶出する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記工程(a)～(e)を含むことを特徴とする植物DNAの抽出精製方法。

(a) 植物材料に界面活性剤および必要によりタンパク変性剤を含む溶解液を混合して、植物材料中の細胞を溶解し、

(b) 得られた細胞溶解液に界面活性剤を抽出する有機溶媒を加えて、混合した後、水相と有機溶媒相を分離し、

(c) 得られた水相にカオトロピック物質を含む吸着液および核酸結合性固相担体を中性乃至弱アルカリ性条件下に混合させて、植物材料中の細胞に含まれるDNAを核酸結合性固相担体上に吸着させ、

(d) DNAを吸着させた核酸結合性固相担体を洗浄液にて洗浄して、植物細胞中に含まれる糖類およびタンパク類を除去し、次いで、

(e) 核酸結合性固相担体に結合したDNAを溶出する。

【請求項2】 界面活性剤が陽イオン界面活性剤である請求項1記載のDNA抽出精製方法。

【請求項3】 界面活性剤がセチルトリメチルアンモニウムブロミドである請求項1記載のDNAの抽出精製方法。

【請求項4】 タンパク変性剤がカオトロピック物質である請求項1記載のDNA抽出精製方法。

【請求項5】 有機溶媒がクロロホルムまたはクロロホルムとイソアミルアルコールの混合物である請求項1記載のDNA抽出精製方法。

【請求項6】 核酸結合性固相担体が粒子である請求項1記載のDNAの抽出精製方法。

【請求項7】 核酸結合性固相担体に結合したDNAを溶出する溶出液が、水あるいはTEバッファーである請求項1記載のDNAの抽出精製方法。

【請求項8】 核酸結合性固相担体が超常磁性金属酸化物を含む担体であって、さらに、磁力を利用して核酸結合性固相担体と液相を分離する工程を含むことを特徴とする請求項1記載のDNAの抽出精製方法。

【請求項9】 (1) 界面活性剤および必要によりタンパク変性剤を含む溶解液、(2) 界面活性剤を抽出する有機溶媒、(3) カオトロピック物質を含む吸着液、

(4) 核酸結合性固相担体、(5) 洗浄液および(6) 溶出液を含むことを特徴とする植物DNA抽出精製用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は植物の組織、種子、根、花卉などの植物材料から、核酸結合性固相担体を用いて、DNAを簡便かつ純度よく抽出精製する方法ならびに該方法に用いるDNAを抽出精製するための試薬に関する。該試薬は自動核酸抽出装置にも応用しうる。

【0002】

【従来の技術】 核酸を含有する植物組織、種子、根、花卉などの植物材料から、核酸を抽出精製することは、これらの植物の品種改良や遺伝子工学を用いた植物培養細胞における有用物質の生産などの分野で重要なステップである。例えば、ある遺伝子について解析しようとする場合や、遺伝子の導入を確認する場合などは、まず、その遺伝子を保持する植物組織、種子、根、花卉などの植物材料から、その遺伝子、特にDNAを抽出することが必要である。

【0003】 一般に、生物材料に含まれるDNAやRNAなどの核酸は、遊離した状態で存在するわけではなく、タンパク質、脂質、糖から構成される細胞膜や細胞壁等の殻の中に存在し、ほとんどの場合、核酸自身もタンパクとの複合体を形成している。したがって、生物材料から核酸を抽出精製する場合には、まず超音波や熱による物理的破碎処理やプロテアーゼによる酵素処理、界面活性剤や変性剤による処理等を施すことにより、核酸を遊離させ、さらに、フェノール等の有機溶媒による抽出操作や超遠心分離、イオン交換体等の担体を使用したカラムクロマトグラフィー等により、破碎物中から核酸を精製する必要がある。これらの手法は、核酸や出発材料、さらには抽出した核酸の用途に応じて組み合わせられ、それぞれ最適化されて用いられている。

【0004】 植物組織、種子、根、花卉等の植物材料からDNAを抽出精製する方法としては、CTAB(セチルトリメチルアンモニウムブロミド)法[1980. Nucl. Acid. Res. 8:4321-4325]が一般的によく用いられている。このCTAB法とは、下記工程を含む。

(1) 植物組織、種子、根、花卉等の植物材料を乳鉢、乳棒等を用いて、液体窒素中でパウダー状になるまで粉碎した後、CTAB溶液を加えて、該材料中の植物細胞を溶解し、これによりDNAを抽出し、かつ、タンパク、ポリサッカライドなどのDNA以外の成分をCTABに結合させ、複合体とする。

(2) 次に、クロロホルムなどの有機溶媒を用いて、CTABとタンパク、ポリサッカライドの複合体を有機溶媒層へ移行させ、DNAが含まれる水相のみを分離する。

(3) この水相に塩濃度を下げたCTAB溶液(沈殿バッファー)を添加することにより、DNAを不溶化させ、CTAB-DNA複合体を沈殿させる。

(4) そして、イソプロパノール沈殿もしくは必要に応じて、塩化セシウム密度勾配遠心法(超遠心)によりDNAを精製する。

【0005】 この方法は数10 $\mu$ gものDNAが抽出可能であるという利点をもつが、CTABによるDNAの沈殿、ならびにイソプロパノール沈殿、あるいは超遠心分離という長時間を要するステップが必要なため、多数のサンプルを迅速に解析する必要がある場合には、より

簡便かつ短時間でDNAが抽出精製できる方法が要求される。

【0006】一方、簡便な核酸抽出法として、シリカ粒子を核酸結合性固相担体として使用する方法がある（特開平2-289596号公報）。この方法は、細胞などの生物材料にカオトロピック溶液、核酸結合性固相担体を添加することで、核酸を一段階で抽出する手法である。さらに、溶出液に水またはTEバッファーなど低濃度の緩衝液を使用するため、エタノール沈殿法などの脱塩、濃縮のための操作を経ることなく、抽出した核酸を直ちに後の解析に直接使用することができるという利点がある。しかしながら、この方法により植物組織、種子、根、花卉等の植物材料からDNAの抽出を試みた場合、植物細胞のもつ、セルロースを主体とした強固な細胞壁により、カオトロピック溶液による細胞の溶解が不十分であったり、植物細胞に豊富に含まれるポリサッカライドやポリフェノールなどの二次代謝産物が、DNAの核酸結合性固相担体への吸着を阻害するため、動物細胞などと比較して、DNAの収量が非常に少ないという欠点を有する。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、上記問題点を解決することにより、植物組織、種子、根、花卉等の植物材料からDNAを煩雑な操作を必要とすることなく、短時間で抽出し、精製する方法を提供することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために種々、鋭意検討した結果、植物材料にまず、界面活性剤を用いた前処理を行い、次いで、カオトロピック剤の存在下に、核酸結合性固相担体により、植物材料からDNAを簡便に抽出精製し得ることを見出し、本発明に到達した。

【0009】すなわち、本発明は、下記工程（a）～（e）を含むことを特徴とする植物DNAの抽出精製方法。

（a）植物材料に界面活性剤および必要によりタンパク変性剤を含む溶解液を混合して、植物材料中の細胞を溶解し、（b）得られた細胞溶解液に界面活性剤を抽出する有機溶媒を加えて、混合した後、水相と有機溶媒相を分離し、（c）得られた水相にカオトロピック物質を含む吸着液および核酸結合性固相担体を中性乃至弱アルカリ性条件下に混合させて、植物材料中の細胞に含まれるDNAを核酸結合性固相担体上に吸着させ、（d）DNAを吸着させた核酸結合性固相担体を洗浄液にて洗浄して、植物細胞中に含まれる糖類およびタンパク類を除去し、次いで、（e）核酸結合性固相担体に結合したDNAを溶出する。

【0010】また、本発明は（1）界面活性剤および必要によりタンパク変性剤を含む溶解液、（2）界面活性

剤を抽出する有機溶媒、（3）カオトロピック物質を含む吸着液、（4）核酸結合性固相担体、（5）洗浄液および（6）溶出液を含むことを特徴とする植物DNA抽出精製用試薬である。

【0011】

【発明の実施態様】本発明において用いられる植物材料としては、例えば、植物の組織や培養細胞のほか、種子、根、花卉などが挙げられる。植物としては、単子葉植物、双子葉植物などがあり、単子葉植物としては、イネ、トウモロコシ、ムラサキツユクサ、パイナップル、コムギ、エンバク、サトイモなどが挙げられる。また、双子葉植物としては、タバコ、シロイヌナズナ、ケナフ、ジャガイモ、サツマイモ、アサガオ、メロン、ナス、ニンジン、ナタネ、ワタ等の草本性植物、ユーカリ、アカシア、コーヒー等の常緑広葉樹、ポプラ、クヌギ、ヤナギ、シラカバ、コナラ等の落葉樹などの木本性植物などが挙げられる。

【0012】本発明に使用する溶解液とは、細胞膜の破壊あるいは細胞中に含まれるタンパク質を変性させる目的で使用する液体であり、界面活性剤を含有する。必要により、タンパク変性剤を添加してもよい。界面活性剤としては、一般に細胞等から核酸を抽出する際に使用されるものであれば、特に限定されないが、具体例としては、ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド、ドデシルトリメチルアンモニウムクロリド、セチルトリメチルアンモニウムブロミド等の陽イオン界面活性剤、ドデシル硫酸ナトリウム、N-ラウロイルサルコシナトリウム、コール酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、サルコシン等の陰イオン界面活性剤、トウイーン系界面活性剤、トリトン系界面活性剤などの非イオン界面活性剤、ホスファチジルエタノールアミン等の両性界面活性剤が挙げられる。特に、陽イオン界面活性剤が好ましく、さらにセチルトリメチルアンモニウムブロミドが好ましい。これらの界面活性剤は単独で、あるいは2種以上併用してもよい。これらの界面活性剤の使用濃度は、界面活性剤の種類により異なり、通常、0.1～10容量%であり、例えば、セチルトリメチルアンモニウムブロミドを使用する場合には、0.1～5容量%の範囲となるのが好ましい。

【0013】タンパク変性剤としては、グアニジン塩酸塩、グアニジンチオシアン酸塩、グアニジン炭酸塩などのグアニジン塩、尿素などを含むカオトロピック物質などを挙げられる。特にグアニジン塩酸塩、グアニジンチオシアン酸塩などが好ましい。タンパク変性剤の使用濃度は、用いられる物質により異なり、通常、10～80容量%、好ましくは40～75容量%である。

【0014】本発明において使用する上記界面活性剤を抽出する有機溶媒とは、DNAの固相への結合を妨げるものでなく、かつ、溶解液中の界面活性剤を溶媒中に抽出しうるものであれば、特に限定されない。本発明にお

いて用いられる有機溶媒の具体例としては、水飽和フェノール、緩衝液飽和フェノール、クロロホルム、メタノール、1-ブタノール、3-メチル-1-プロパノール、アセトン等が挙げられる。これらのうち、有機溶媒を2種以上混合したものが好ましく、さらにクロロホルムと3-メチル-1-プロパノールを適当な割合で混合したものが好ましい。混合比は、有機溶媒の種類により選択されるが、例えばクロロホルム：3-メチル-1-プロパノール＝24：1～48：1（容量比）である。

【0015】本発明に使用する吸着液には、カオトロピック物質が含まれる。カオトロピック物質としては、一般にカオトロピック物質として知られているような、疎水性分子の水溶性を増加させる作用を有しており、さらにDNAの固相への結合に寄与するものであれば、特に限定されない。具体的には、グアニジンチオシアン酸塩、グアニジン塩酸塩、沃化ナトリウム、沃化カリウム、過塩素酸ナトリウム等が挙げられる。カオトロピック物質の使用濃度は、用いられるカオトロピック物質により異なり、通常、約1～8M、好ましくは3～5Mであり、例えば、グアニジン塩酸塩を使用する場合には、4～7.5Mの範囲である。

【0016】本発明において使用するカオトロピック物質を含む吸着液には、緩衝剤を含有させることが好ましい。これは、予め吸着液に含まれていても、また、細胞を溶解した後に緩衝液として添加してもよい。この緩衝剤としては、一般に使用されるものであれば、特に限定されないが、中性乃至弱アルカリ性条件、すなわち、pH7～9において緩衝能を有するものがより好ましい。例えば、トリス塩酸、四ホウ酸ナトリウム塩酸、リン酸二水素カリウム-四ホウ酸ナトリウム緩衝液等が挙げられ、その使用濃度としては1～500mM、pHは7～9の範囲が好適である。

【0017】本発明において用いられる核酸結合性固相担体としては、カオトロピックイオンの存在下で、核酸を吸着、すなわち可逆的な結合により保持することができる親水性表面を有する担体であれば、特に限定されない。具体例としては、二酸化ケイ素、すなわち、シリカが好ましく用いられる。また、核酸との可逆的な結合を妨げるようなものでなければ、シリカから構成される他の物質、例えばガラス、ケイソウ土、あるいはこれらを化学的修飾により表面処理を施したものや、超常磁性金属酸化物等の他の物質との複合体も含まれる。また、この核酸結合性固相担体の形態としては、粒子、フィルター、反応容器等が具体的に挙げられるが特に限定されない。これらのうち、吸着と溶出の効率を考慮すると粒子の形態がより好ましく、この際、粒径は0.05～500μmがより好適である。

【0018】本発明において用いられる洗浄液としては、固相担体からのDNAの溶離を促進するものでなく、かつ、RNA、タンパク類、糖類の固相への結合を

妨げるものであれば、特に限定されない。具体的には、4～7.5Mグアニジン塩酸塩溶液あるいは40～70%エタノールが好ましく、これらの洗浄液を併用するとより好適である。つまり、まず、グアニジン塩酸塩溶液で洗浄した後、さらに40～70%エタノールで洗浄するのが好ましい。また、初めに溶解・吸着工程にて使用した吸着液を洗浄液として使用すると、ゲノムDNAとタンパクの除去により有効である。このとき、続いて40～70%エタノールで洗浄するのが好ましい。

【0019】本発明において用いられる溶出液としては、固相からのDNAの溶離を促進するものであれば、特に限定されない。具体的には、水あるいはTEバッファー（10mMトリス塩酸緩衝液、1mMEDTA、pH8.0）が好ましい。

【0020】本発明によるDNAの抽出精製方法は、

（a）植物材料中の細胞を界面活性剤および必要によりタンパク変性剤を含む溶解液で植物細胞を溶解する工程、（b）上記（a）にて使用した有機溶媒を除去する工程、（c）溶解された細胞中のDNAをカオトロピック物質の存在下に核酸結合性担体に吸着させる工程、

（d）吸着されたDNAと糖類およびタンパク類を分離するために、核酸結合性担体を洗浄する工程および

（e）該核酸結合性担体から吸着されたDNAを溶出する工程の5段階に大きく分けられる。本発明では、核酸結合性固相担体が超常磁性金属酸化物を含む粒子であって、さらに磁力を利用して核酸結合性固相担体と液相を分離する工程を含むことがある。

【0021】（a）細胞溶解工程では、植物組織、種子、根、花弁などの植物材料を乳鉢、乳棒等を用いて、液体窒素中でパウダー状になるまで粉碎、または液体窒素を用いずに上記試料を適当な方法ですりつぶした後、界面活性剤および必要によりタンパク変性剤を含む溶解液を加え、細胞を溶解する。

【0022】（b）有機溶媒を除去する工程では、

（a）細胞溶解工程で使用した溶解液をクロロホルムなどの上記有機溶媒で抽出する。具体的には、得られた細胞溶解液に界面活性剤を抽出する有機溶媒を加えて、混合した後、水相と有機溶媒相を分離する。

【0023】（c）次いで、吸着工程では、水相にカオトロピック物質を含む溶液および核酸結合性固相担体を中性乃至弱アルカリ性条件下、好ましくはpH7～9付近にて添加する。このカオトロピック溶液、核酸結合性固相担体は別々に添加しても、あるいは同時に添加しても良い。

【0024】（d）洗浄工程は、上記（a）～（c）工程を経て得られた植物材料、溶解液、吸着液、核酸結合性固相担体の混合物から、DNAを吸着した核酸結合性固相担体のみを可能な限り分離する工程である。このとき、洗浄液を使用して、約2～3回程度、繰り返し洗浄することが好ましい。

【0025】本発明における液相と固相との具体的な分離手段としては、使用する核酸結合性固相担体の形態により異なり、核酸結合性固相担体が粒子の形態である場合には、遠心分離、ろ過、カラム操作等が好ましい。さらには、粒子内に超常磁性金属酸化物を含ませておいたものを固相担体として使用すれば、磁石等を用いた簡便な磁気分離法が可能となり、より好適である。

【0026】(e) 溶出工程は、上記(d)工程におけるDNAが吸着した核酸結合性固相担体から該DNAを溶離させる工程である。このとき回収したDNAは、透析やエタノール沈殿法等の脱塩、濃縮操作を施すことなく、制限酵素やDNAポリメラーゼ等を使用した酵素反応に直接使用することができる。

【0027】本発明によるDNAの抽出精製方法は、単純な工程から構成されるため、固相の分離操作や試薬分注操作を自動化した核酸抽出装置へ容易に応用しうる。

【0028】本発明のDNAの抽出精製試薬は、(1)界面活性剤および必要によりタンパク変性剤を含む溶解液、(2)界面活性剤を抽出する有機溶媒、(3)カオトロピック物質を含む吸着液、(4)核酸結合性固相担体、(5)洗浄液および(6)溶出液を含む。試薬キットとしては、上記(1)～(6)を任意に組み合わせる。その組成比は、使用目的に応じて種々選択されるが、その一例としては、(1)界面活性剤および必要によりタンパク変性剤を含む溶解液、約100～400 $\mu$ l、(2)界面活性剤を抽出する有機溶媒、約100～400 $\mu$ l、(3)カオトロピック物質を含む吸着液、約400～800 $\mu$ l、(4)核酸結合性固相担体、約10～100 $\mu$ l、(5)洗浄液、約500～1000 $\mu$ lおよび(6)溶出液、約50～200 $\mu$ lがある。

【0029】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### 実施例1

##### タバコ緑葉からのDNAの抽出

核酸抽出試料として、タバコ緑葉を用い、(i)下記CTAB(セチルトリメチルアンモニウムブロミド)溶液(本発明)、(ii)カオトロピック物質だけを含む溶液(従来法)の2種類の溶解液で、DNA抽出の比較を行った。タバコの葉を採取後、直ちに液体窒素にて凍結し、予め液体窒素で冷却した乳鉢、乳棒を用いてパウダ一状になるまで粉碎し、これをDNA抽出試料とした。

【0030】この抽出試料100mgに300 $\mu$ lの下記溶解液

本発明:

3% CTAB

1. 5M 塩化ナトリウム

100mM トリスー塩酸緩衝液(pH7.9)

20mM EDTA(pH8.0)

従来法:

7M グアニジン塩酸塩

50mM トリスー塩酸緩衝液(pH7.5)

を加えて、10秒間ボルテックスミキサーで攪拌した後、65℃の湯浴で10分間加熱し、細胞を溶解させるとともに、ポリサッカライド、タンパクのCTABとの結合を促進した。この10分間の間に5秒間の攪拌を2回行った。

【0031】続いて、300 $\mu$ lのクロロホルム溶液(クロロホルム:イソアミルアルコール=24:1)を加えて、よく攪拌した後、12,000回転で1分間遠心分離を行い、水層を回収した。これを7Mグアニジン塩酸塩で、850 $\mu$ lにボリュームアップし、40 $\mu$ lの0.5g/ml磁性シリカ粒子(粒径1～10 $\mu$ m、四三酸化鉄粒子30%含有、比表面積280m<sup>2</sup>/g、細孔容積0.025ml/g、表面細孔直径2～6nm:鈴木油脂社製)の懸濁液を添加し、室温で10分間攪拌した。

【0032】次に、マイクロチューブを磁気スタンド

(MPC-M:ダイナル社製)に設置して磁性シリカ粒子を集め、上清を除去した。さらに、マイクロチューブを磁気スタンドから外し、900 $\mu$ lの洗浄液(7Mグアニジン塩酸塩、50mM トリスー塩酸(pH7.5))を加えて十分に攪拌した後、同様に磁気スタンドに設置して上清を除去することにより、粒子を洗浄した。同様にして、900 $\mu$ lの洗浄液にて再度、粒子を洗浄し、続いて900 $\mu$ lの70%エタノールで2回粒子を洗浄した。上清を除去した後、100 $\mu$ lのTEバッファーを添加し、室温で10分間攪拌した後、磁気スタンドに設置して磁性シリカ粒子を集め、上清を回収した。回収液量はおよそ100 $\mu$ lであった。

【0033】抽出精製は各溶解液について、n=2で行い、抽出精製液のうち、5 $\mu$ lをアガロースゲル電気泳動に供し、エチジウムブロミド染色後、写真撮影した結果を図1に示す。レーン1はラムダファージDNAのHindIII消化物からなるサイズマーカー、レーン2、3は本発明法で抽出したもの、レーン4、5はカオトロピック物質を含む溶液だけで抽出したもの(従来法)を示している。図1から、本発明方法による抽出精製物が、従来法の抽出精製物と比較して、収量が大幅に改善されていることが確認できた。

【0034】参考例1

##### PCRによるrbcL遺伝子の検出

上記実施例1にて得られた抽出精製液(本発明)に対して、rbcL遺伝子(Ribulose-1,5-bisphosphate carb oxylase/oxygenase large subunit gene、葉緑体ゲノム上に存在)をターゲットとして、PCRを行うことにより、該抽出精製液中の葉緑体由来DNAの検出を試みた。設計したプライマーの増幅断片は約1.3kbである。PCRには、KODDASH DNAポリメラーゼ(東洋紡績社製)を用いた。鋳型には実施例1で抽出精

製したDNAを100ng用いた。反応は全量を100μlとし、94℃で1分間ホットスタートを行った後、98℃、20秒間、62℃、2秒間、74℃、90秒間を30サイクル実施して、PCRを行った。なお、PCRはDNAサーマルサイクラーPJ2000(Perkin Elmer社製)で実施した。反応液のうち、5μlをアガロースゲル電気泳動に供し、エチジウムブロミド染色後、写真撮影した結果を図2に示す。

【0035】 図中、レーン1、8はラムダファージDNAのHindIII消化物からなるサイズマーカー、レーン2、3は実施例1に示す方法により抽出精製したDNAのPCR増幅産物の泳動パターンを示している。約1.3kbの目的の増幅断片が得られ、葉緑体DNAの抽出精製ならびに抽出精製したDNAがそのまま、PCRに用いることができることが確認できた。

#### 【0036】 参考例2

rbcL-MT(Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit N-methyltransferase gene、核ゲノム上に存在)をターゲットとして、PCRを行うことにより、実施例1にて得られた抽出精製液(本発明)中の核由来DNAの検出を試みた。プライマーは2組設計し、それぞれの増幅断片は、①約2.2kb、②約4.6kbである。PCRには、KOD Dash DNAポリメラーゼ(東洋紡績社製)を用いた。鋳型には実施例1で抽出精製したDNAを100ng用いた。反応は全量を100μlとし、94℃で1分間ホットスタートを行った後、

#### ①2.2kb断片

98℃、20秒間、65℃、2秒間、74℃、2分間を30サイクル

#### ②4.6kb断片

98℃、20秒間、66℃、2秒間、74℃、4分間を35サイクル

実施し、PCRを行った。なお、PCRはDNAサーマルサイクラーPJ2000(Perkin Elmer社製)で実施した。

【0037】 反応液のうち、7μlをアガロースゲル電気泳動に供し、エチジウムブロミド染色後、写真撮影した結果を図2に示す。図中、レーン1、8はラムダファージDNAのHindIII消化物からなるサイズマーカー、レーン4、5は実施例1にて抽出精製したDNAの2.2kbのPCR増幅産物の泳動パターン、レーン6、7は実施例1にて抽出精製したDNAの4.6kbのPCR増幅産物の泳動パターンを示している。それぞれ約2.2kb、4.6kbの目的の増幅断片が得られ、核DNA抽出ならびに抽出したDNAがそのまま、PCR、さらにはlong PCRに用いることができることが確認できた。

#### 【0038】 実施例2

##### タバコ緑葉からのDNAの抽出

核酸抽出試料として、タバコ緑葉を用い、(i)下記CTAB(セチルトリメチルアンモニウムブロミド)およびグアニジン塩酸塩を含む溶液(本発明)、(ii)グアニジン塩酸塩だけを含む溶液(従来法)の2種類の溶解液で、DNA抽出の比較を実施例1と同様に行った。

#### 【0039】 下記溶解液

##### 本発明:

3% CTAB

3M グアニジン塩酸塩

1. 5M 塩化ナトリウム

100mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.9)

20mM EDTA(pH8.0)

##### 従来法:

7M グアニジン塩酸塩

50mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.5)

【0040】 抽出精製は各溶解液について、n=2で行い、抽出精製液のうち、5μlをアガロースゲル電気泳動に供し、エチジウムブロミド染色後、写真撮影した結果を図3に示す。レーン1はラムダファージDNAのHindIII消化物からなるサイズマーカー、レーン2、3は本発明法で抽出したもの、レーン4、5はカオトロピック物質を含む溶液だけで抽出したもの(従来法)を示している。図3から、本発明方法による抽出精製物が、従来法の抽出精製物と比較して、収量が大幅に改善されていることが確認できた。

#### 【0041】

【発明の効果】 本発明によれば、界面活性剤および必要によりタンパク変性剤を含む溶解液を使用し、界面活性剤を除去した後、カオトロピック物質を含む吸着液および核酸結合性固相を中性乃至弱アルカリ性条件下に使用することにより、植物材料に含まれるDNAを特異的に該固相に吸着させ、さらに溶出液を使用して、洗浄液にて糖類およびタンパク類を除去して、煩雑な後処理操作を必要とすることなく、植物DNAを簡便に回収し、抽出精製することができる。さらに、本発明では植物細胞のもつセルロースを主体とした強固な細胞壁によるカオトロピックを含む溶液による細胞の不十分な溶解、植物細胞に豊富に含まれるポリサッカライドやポリフェノールなどの二次代謝産物による、DNAの核酸結合性固相担体への吸着阻害などの問題点を解決することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明方法または従来法により、タバコ緑葉から抽出精製されたDNAのアガロースゲル電気泳動パターンを示す図面に代える写真である。

【図2】 本発明方法により、タバコ緑葉から抽出精製された葉緑体DNAおよび核由来DNAのPCR増幅産物のアガロースゲル電気泳動パターンを示す図面に代える写真である。

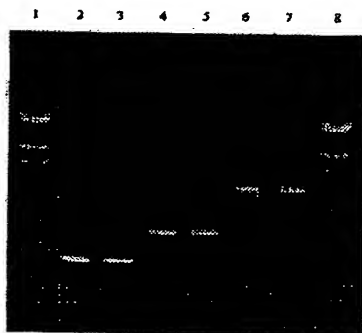
【図3】 本発明方法または従来法により、タバコ緑葉

から抽出精製されたDNAのアガロースゲル電気泳動パターンを示す図面に代える写真である。

【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(72)発明者 川上 文清  
福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株  
式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 川村 良久  
福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株  
式会社敦賀バイオ研究所内

[Title of the Invention] Method for Extracting and Purifying Plant DNA

[Claims]

[Claim 1] A method for extracting and purifying plant DNA comprising the steps of

(a) mixing plant material with a lysis solution containing a surfactant and an optional protein denaturant to lyse cells in the plant material,

(b) adding an organic solvent for extracting the surfactant to the resulting solution containing the cell lysate, and then separating the aqueous phase from the organic solvent phase,

(c) mixing the resulting aqueous phase with an adsorption solution containing a chaotropic substance and a nucleic acid-adsorbing solid carrier under neutral to weakly alkaline conditions to adsorb the DNA contained in the cells of the plant material on the nucleic acid-adsorbing solid carrier,

(d) washing the nucleic acid-adsorbing solid carrier that has adsorbed the DNA with a washing solution to remove saccharides and proteins contained in the plant cell, and

(e) eluting the DNA that has been adsorbed on the nucleic acid-adsorbing solid carrier.

[Claim 2] A method for extracting and purifying DNA according to claim 1 wherein the surfactant is a cationic surfactant.

[Claim 3] A method for extracting and purifying DNA according to claim 1 wherein the surfactant is a cetyltrimethylammonium bromide.

[Claim 4] A method for extracting and purifying DNA according to claim 1 wherein the protein denaturant is a chaotropic substance.

[Claim 5] A method for extracting and purifying DNA according to claim 1 wherein the organic solvent is chloroform or a mixture of chloroform and isoamyl alcohol.

[Claim 6] A method for extracting and purifying DNA according to claim 1 wherein the nucleic acid-adsorbing solid carrier is a particle.

[Claim 7] A method for extracting and purifying DNA according to claim 1 wherein the solution used for eluting the DNA adsorbed on the nucleic acid-adsorbing solid carrier is water or TE buffer.

[Claim 8] A method for extracting and purifying DNA according to claim 1 wherein the nucleic acid-adsorbing solid carrier is a carrier containing a superparamagnetic metal

oxide, and the method further comprises the step of separating the nucleic acid-adsorbing solid carrier and the liquid phase by means of magnetism.

[Claim 9] A reagent set for extracting plant DNA comprising (1) a solution containing a surfactant and an optional protein denaturant, (2) an organic solvent for extracting the surfactant, (3) an adsorption solution containing a chaotropic substance, (4) a nucleic acid-adsorbing solid carrier, (5) a washing solution, and (6) an elution solution.

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Technical Field to which the Invention Pertains] The present invention relates to a method for extracting and purifying DNA from a plant material such as seed, root, or petal in a convenient manner and at a high purity by using a nucleic acid-adsorbing solid carrier. This invention also relates to a reagent set for extracting and purifying the DNA adapted for use in such a method. This reagent set may be used in an automatic nucleic acid extraction system.

[0002]

[Prior Art] Extraction and purification of the nucleic acid from a plant material such as plant tissue, seed, root, or petal containing the nucleic acid is an important step in the field of breeding of such plants or production of useful substances in plant cell culture by genetic engineering means. For example, when a certain gene is to be analyzed, or when introduction of a certain gene is to be confirmed, extraction of the gene, and in particular, extraction of the DNA from the plant material such as plant tissue, seed, root, or petal containing such gene is required.

[0003]

Nucleic acids such as DNA and RNA exist in a biological material typically not in a free state, but in a shell such as cell membrane or cell wall constituted from a protein, lipid, saccharide, or the like. Moreover, in most cases, the nucleic acid is present as a complex with a protein. Accordingly, when a nucleic acid is extracted and purified from a biological material, the nucleic acid should be first released from the cell by physical rupturing such as ultrasonication or heat application, an enzymatic treatment by a protease, treatment by a surfactant or a denaturant, or the like, and then, the released nucleic acid should be purified from the ruptured product by extraction using an organic solvent such as phenol, ultrafiltration, column chromatography using a carrier such as an ion exchanger, or the like. Such techniques may be combined and optimized depending on the type of the nucleic acid or the starting material, or application of the extracted nucleic acid.

[0004]

In extracting and purifying DNA from a plant material such as plant tissue, seed, root, or petal, use of CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) method [1980. Nucl. Acid. Res. 8: 4321-4325] is popular. This CTAB method comprises the following steps:

(1) pulverizing a plant material such as plant tissue, seed, root, or petal to powder in liquid nitrogen with a mortar and a pestle, and adding CTAB solution to lyse the plant cells in the material to thereby extract DNA, and simultaneously, bond components of the cell other than the DNA such as proteins and polysaccharides to the CTAB for formation of a complex;

(2) transferring the complex of the CTAB with the proteins or the polysaccharides to the organic solvent layer by using an organic solvent such as chloroform to thereby separate and collect the aqueous phase containing the DNA;

(3) adding CTAB solution (precipitation buffer) having a reduced salt concentration to the aqueous phase to insolubilize the DNA for precipitation of the CTAB-DNA complex; and

(4) purifying the DNA by precipitating from isopropanol, and optionally, by density-gradient centrifugation (ultracentrifugation) using cesium chloride.

[0005]

This method has the merit that as much as several ten  $\mu\text{g}$  of DNA can be extracted. However, this method requires steps such as DNA precipitation, isopropanol precipitation, or ultracentrifugation that requires long time, and when a large number of samples should be quickly analyzed, a more convenient method which enables extraction and purification of the DNA in a short time is required.

[0006]

In the meanwhile, there is a convenient nucleic acid extraction method which uses silica particles for the nucleic acid-adsorbing solid carrier (Japanese Patent Application Laid-Open No. 2-289596). In this method, nucleic acid is extracted in one step by adding a chaotropic solution and a nucleic acid-adsorbing solid carrier to the biological material such as cell. This method also has the merit that the extracted nucleic acid can be directly used in the subsequent analysis without conducting ethanol precipitation or other treatment for the purpose of desalting or concentrating since the elution solution used is a low concentration buffer such as water or TE buffer. However, when the extraction of the DNA from a plant material such as plant tissue, seed, root, and petal is attempted by this method, some inconvenience occurred including insufficient cell lysis by the chaotropic solution due to the presence of the rigid cell wall of the plant cell constituted primarily by cellulose, and extremely low

yield of the DNA compared to animal cells due to the hindrance of the DNA adsorption onto the nucleic acid-adsorbing solid carrier by the second metabolites such as polysaccharides and polyphenols which are abundant in the plant cell.

[0007]

[Problems to Be Solved by the Invention] An object of the present invention is to solve the problems as described above by providing a method for extracting and purifying DNA from a plant material such as plant tissue, seed, root, or petal, which can be accomplished in a short time without requiring complicated operations.

[0008]

[Means for Solving the Problems] In order to solve such problems, the inventors of the present invention made various intensive investigations, and found that when the plant material is preliminarily treated with a surfactant, and then brought in contact with a nucleic acid-adsorbing solid carrier in the presence of a chaotropic agent, DNA can be conveniently extracted and purified from the nucleic acid-adsorbing solid carrier. The present invention has been achieved on the bases of such finding.

[0009]

Accordingly, the present invention provides a method for extracting and purifying plant DNA comprising the steps of

- (a) mixing a plant material with a solution containing a surfactant and an optional protein denaturant to lyse cells in the plant material,
- (b) adding an organic solvent for extracting the surfactant to the resulting solution containing the cell lysate, and then separating the aqueous phase from the organic solvent phase,
- (c) mixing the resulting aqueous phase with an adsorption solution containing a chaotropic substance and a nucleic acid-adsorbing solid carrier under neutral to weakly alkaline conditions to adsorb the DNA contained in the cells of the plant material on the nucleic acid-adsorbing solid carrier,
- (d) washing the nucleic acid-adsorbing solid carrier that has adsorbed the DNA with a washing solution to remove saccharides and proteins contained in the plant cell, and
- (e) eluting the DNA that has been adsorbed on the nucleic acid-adsorbing solid carrier.

[0010]

The present invention also provides a reagent set for extracting plant DNA comprising (1) a solution containing a surfactant and an optional protein denaturant, (2) an organic solvent for extracting the surfactant, (3) an adsorption solution containing a

chaotropic substance, (4) a nucleic acid-adsorbing solid carrier, (5) a washing solution, and (6) an elution solution.

[0011]

[Embodiments of the Invention] The plant materials which may be used in the present invention include plant tissues, cultured cells, as well as seed, root, petal of the plant. Exemplary plants used include monocotyledons and dicotyledons, and examples of the monocotyledon include rice, maize, spiderwort, pineapple, wheat, oat, and taro. Examples of the dicotyledon include herbaceous plants such as tobacco, Arabidopsis, kenaf, potato, sweet potato, morning glory, melon, egg plant, carrot, colza, and cotton, and woody plants such as evergreen broad-leaved trees, for example, eucalyptus, acacia, and coffee, and deciduous trees such as poplar, *Quercus acutissima*, willow, birch, and *Quercus serrata*.

[0012]

The lysis solution used in the present invention is used for the purpose of breaking the cell membrane or denaturing the protein in the cell, and contains a surfactant, and optionally, a protein denaturant. The surfactant is not particularly limited as long as it is the one generally used for extracting the nucleic acid from the cell, and examples include cationic surfactants such as dodecyltrimethylammonium bromide, dodecyltrimethylammonium chloride, and cetyltrimethylammonium bromide; anionic surfactants such as sodium dodecyl sulfate, sodium N-lauroyl sarcosine, sodium cholate, sodium lauryl sulfate, and sarcosine; nonionic surfactants such as Tween surfactants and triton surfactants; and amphoteric surfactants such as phosphatidyl ethanolamine. The preferred are cationic surfactants, and the more preferred is cetyltrimethylammonium bromide. Such surfactant may be used alone or in combination of two or more, and at a concentration depending on the type of the surfactant. The concentration is generally 0.1 to 10% by volume, and in the case of cetyltrimethylammonium bromide, it may be used at 0.1 to 5% by volume.

[0013]

Exemplary protein denaturants include chaotropic substances such as guanidine salts, for example, guanidine chloride, guanidine thiocyanate, and guanidine carbonate, and urea. The preferred are guanidine chloride and guanidine thiocyanate. The protein denaturant is used at a concentration which depends on the substance used, and generally, at a concentration of 10 to 80% by volume, and preferably, at a concentration of 40 to 75% by volume.

[0014]

The organic solvent for extracting the surfactant used in the present invention is not particularly limited as long as it does not inhibit adsorption of the DNA to the solid phase and it is capable of extracting the surfactant in the lysis solution into the solvent. Examples of the organic solvent used in the present invention include water-saturated phenol, buffer-saturated phenol, chloroform, methanol, 1-butanol, 3-methyl-1-propanol, and acetone. Among these, the preferred is the one comprising a mixture of two or more organic solvents, and more preferred is the one comprising a mixture of chloroform and 3-methyl-1-propanol at an adequate ratio. The mixing ratio may be selected depending on the type of the organic solvents used, and exemplary ratio for chloroform and 3-methyl-1-propanol is 24:1 to 48:1 (volume ratio).

[0015]

The adsorption solution used in the present invention contains a chaotropic substance. The chaotropic substance is not particularly limited as long as it has the action of increasing water solubility of a hydrophobic molecule generally known for a chaotropic substance, and it contributes for the binding of the DNA to the solid phase. Exemplary chaotropic substances include guanidine thiocyanate, guanidine chloride, sodium iodide, potassium iodide, and sodium perchlorate, which are used at a suitable concentration depending on the type of the chaotropic substance. The chaotropic substance is generally used at a concentration of about 1 to 8M, and preferably at 3 to 5M. When guanidine chloride is used, it may be used at a concentration in the range of 4 to 7.5M.

[0016]

The adsorption solution containing a chaotropic substance used in the present invention preferably contains a buffer. The buffer may be preliminarily incorporated in the adsorption solution, or added after the cell lysis. The buffer is not particularly limited as long as it is the one commonly used in the art. The preferred, however, is the one which has buffering ability under the condition of neutral to weakly alkaline conditions, namely, at a pH of 7 to 9. Examples include Tris - HCl, sodium tetraborate - HCl, and potassium dihydrogenphosphate - sodium tetraborate buffers, which are used at a concentration of 1 to 500mM and a pH of 7 to 9.

[0017]

The nucleic acid-adsorbing solid carrier used in the present invention is not particularly limited as long as it is a carrier which has a hydrophilic surface capable of adsorbing nucleic acid, namely, retaining the nucleic acid by reversible bond in the presence of a chaotropic ion. A preferable example is silicon dioxide, that is, silica. The solid carrier may also be a substance constituted from silica, for example, glass,

diatomaceous earth, such substance that has been surface treated by chemical modification, or complex of such substance with another substance such as superparamagnetic metal oxide as long as adsorption of the nucleic acid is not hindered. The nucleic acid-adsorbing solid carrier may be in any desired form, for example, particles, filter, or reaction vessel. Among these, the preferred form is particles in view of the high adsorption and elution efficiency, and such particles may preferably have a particle diameter of 0.05 to 500  $\mu\text{m}$ .

[0018]

The washing solution used in the present invention is not particularly limited as long as it does not promote elution of the DNA from the solid carrier while it prevents bonding of the RNAs, proteins, and saccharides to the solid phase. Preferable examples include 4 to 7.5M solution of guanidine chloride and 40 to 70% ethanol, and the more preferred is the combined use of such washing solutions, for example, by washing the solid carrier with the guanidine chloride solution followed by the washing with the 40 to 70% ethanol. Use of the adsorption solution used in the lysis and adsorption steps for the washing solution is also effective for the removal of the genomic DNA and the proteins. Preferably, in such a case, the solid carrier is subsequently washed with 40 to 70% ethanol.

[0019]

The eluting solution used in the present invention is not particularly limited as long as it promotes elution of the DNA from the solid phase. Preferable examples are water and TE buffer (10mM Tris - HCl buffer, 1mM EDTA, pH 8.0).

[0020]

The method for extracting and purifying DNA of the present invention may be roughly divided into 5 steps of (a) treating a plant material with a lysis solution containing a surfactant and optional protein denaturant to lyse plant cells; (b) removing the organic solvent used in the step (a); (c) adsorbing the DNA in the lysed cell to a nucleic acid-adsorbing carrier in the presence of a chaotropic substance; (d) washing the nucleic acid-adsorbing carrier to separate the adsorbed DNA from saccharides and proteins; and (e) eluting the adsorbed DNA from the nucleic acid-adsorbing carrier. In the present invention, the nucleic acid-adsorbing solid carrier is a particle containing a superparamagnetic metal oxide, and the method may further comprise the step of separating the nucleic acid-adsorbing solid carrier and the liquid phase by using magnetism.

[0021]

In the cell lysis step (a), a plant material such as plant tissue, seed, root, or petal is pulverized to powder in liquid nitrogen with a mortar and a pestle, or alternatively, the sample may be triturated by an adequate means without using the liquid nitrogen, and then, the cells in the pulverized or triturated sample is lysed by adding the lysis solution containing a surfactant, and optionally, a protein denaturant.

[0022]

In the step (b) of removing the organic solvent, the lysis solution used in the cell lysis step (a) is extracted by the organic solvent such as chloroform. More specifically, the organic solvent for extracting the surfactant is added to the solution containing the cell lysate, and after mixing, the aqueous phase is separated from the organic solvent phase.

[0023]

Next, in the adsorption step (c), a solution containing a chaotropic substance and a nucleic acid-adsorbing solid carrier are added to the aqueous phase under neutral to weakly alkaline conditions, preferably at pH around 7 to 9. The chaotropic solution and the nucleic acid-adsorbing solid carrier may be added either separately or simultaneously.

[0024]

The washing step (d) is the step in which the nucleic acid-adsorbing solid carrier having the DNA adsorbed is separated to the maximum degree from the mixture of the plant material, the lysis solution, the adsorption solution, and the nucleic acid-adsorbing solid carrier resulting from the steps (a) to (c). In this step, the washing is preferably repeated for about 2 to 3 times by using the washing solution.

[0025]

The means actually used in the present invention for separating the liquid phase and the solid phase may vary by the form of the nucleic acid-adsorbing solid carrier used, and when the nucleic acid-adsorbing solid carrier is in the form of particles, such particles are preferably separated by centrifugation, filtration, or by passing through a column. In a more preferred embodiment, the particles may be separated by using particles having a superparamagnetic metal oxide impregnated therein for the solid carrier to thereby enable simple separation by means of magnetism using a magnet or the like.

[0026]

The elution step (e) is the step of the elution of the DNA from the nucleic acid-adsorbing solid carrier having the DNA adsorbed thereon obtained in the step (d). The DNA recovered may be directly used in an enzymatic reaction using a restriction

enzyme or DNA polymerase with no further treatment such as desalting or concentration by dialysis, ethanol precipitation, or the like.

[0027]

The method for extracting and purifying DNA of the present invention comprises simple steps, and therefore, such method is readily applicable in a nucleic acid extraction system in which separation of the solid phase and dispensing of reagents have been automated.

[0028]

The reagent set for extracting DNA of the present invention comprises (1) a solution containing a surfactant and an optional protein denaturant, (2) an organic solvent for extracting the surfactant, (3) an adsorption solution containing a chaotropic substance, (4) a nucleic acid-adsorbing solid carrier, (5) a washing solution, and (6) an elution solution. A reagent kit may be provided by adequately combining any of the (1) to (6) as described above at a compositional ratio selected according to the its application. In an embodiment, the kit comprises (1) about 100 to 400  $\mu$ l of the solution containing a surfactant and optional protein denaturant, (2) about 100 to 400  $\mu$ l of the organic solvent for extracting the surfactant, (3) about 400 to 800  $\mu$ l of the adsorption solution containing the chaotropic substance, (4) about 10 to 100 $\mu$  of the nucleic acid-adsorbing solid carrier, (5) about 500 to 1000  $\mu$ l of the washing solution, and (6) about 50 to 200  $\mu$ l of the elution solution.

[0029]

[Examples] Next, the present invention is described in further detail by referring to the Examples which by no means limit the scope of the present invention.

#### Example 1

##### Extraction of DNA from tobacco green leaves

The sample used for the nucleic acid extraction was tobacco green leaves, and the DNA extraction was compared by using two lysis solutions, namely, (i) the solution of CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) as described below (the present invention), and (ii) the solution containing only the chaotropic substance (prior art method). The tobacco leaves were frozen in liquid nitrogen immediately after the picking, and pulverized to powder with a mortar and a pestle that had been preliminarily cooled in liquid nitrogen. The powdered leaves were used for a DNA extraction sample.

[0030]

To 100 mg of the extraction sample was added 300  $\mu$ l of the following lysis solution:

[the present invention]

3% CTAB  
1.5M sodium chloride  
100mM Tris - HCl buffer (pH 7.9)  
20mM EDTA (pH 8.0)

[prior art method]

7M guanidine chloride  
50mM Tris - HCl buffer (pH 7.5)

and the mixture was stirred for 10 seconds in a vortex mixer. The mixture was then heated in a hot water bath at 65°C for 10 minutes for cell lysis and to accelerate binding of the polysaccharides and proteins with the CTAB, and during this 10 minute heating, the mixture was stirred twice for 5 seconds.

[0031]

Next, 300  $\mu$ l of chloroform solution (chloroform : isoamyl alcohol = 24:1) was added, and after sufficient stirring, the mixture was centrifuged at 12,000 rpm for 1 minute. The aqueous layer was recovered, and 7M guanidine chloride was added to a total volume of 850  $\mu$ l. To this solution was added 40  $\mu$ l of 0.5 g/ml suspension of magnetic silica particles (particle diameter, 1 to 10  $\mu$ m; content of triiron tetroxide, 30%; specific surface area, 280 m<sup>2</sup>/g; pore volume, 0.025 ml/g; surface pore diameter, 2 to 6 nm; manufactured by Suzuki Yushil Co., Ltd.), and the mixture was stirred at room temperature for 10 minutes.

[0032]

Next, the microtube was placed in a magnetic stand (MPC-M, manufactured by Dynal) to collect the magnetic silica particles, and the supernatant was removed. After removing the microtube from the magnetic stand, 900  $\mu$ l of washing solution (7M guanidine chloride, 50 mM Tris - HCl, pH 7.5) was added. After sufficient stirring, the microtube was again placed in the magnetic stand and the supernatant was removed to wash the particles. By the same procedure, the particles were again washed with 900  $\mu$ l of washing solution, and then, twice with 900  $\mu$ l of 70% ethanol. After removing the supernatant, 100  $\mu$ l of TE buffer was added, and, after stirring the mixture at room temperature for 10 minutes, the microtube was placed in the magnetic stand to collect the silica particles and recover the supernatant. The amount of supernatant recovered was about 100  $\mu$ l.

[0033]

The extraction and purification were conducted for each solution at n = 2, and 5  $\mu$ l of the purified extract was subjected to agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. The electropherogram is shown in FIG. 1 in which lane 1 shows

the pattern for the size marker comprising Hind III digestion product of  $\lambda$  phage DNA; lanes 2 and 3 show the pattern for the extract obtained by the method of the present invention; and lanes 4 and 5 shows the pattern for the extract obtained by the extraction using a solution containing only the chaotropic substance (prior art method). FIG. 1 confirmed the remarkably improved yield of the purified extract obtained by the method of the present invention compared to the purified extract obtained by the prior art method.

[0034]

#### Reference Example 1

##### Detection of *rbcL* gene by PCR

The purified extract (of the present invention) obtained in Example 1 was subjected to PCR by using *rbcL* gene (gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, present on the genome of chloroplast) for the target as an attempt to detect DNF from chloroplast in the purified extract. The size of the amplification fragment by the primer was about 1.3 kb. PCR was conducted by using KOD Dash DNA polymerase (manufactured by Toyobo). 100 ng of the DNA extracted and purified in Example 1 was used for the template. The PCR was conducted for the total volume of 100  $\mu$ l, and after the hot start at 94°C for 1 minute, 30 cycles each comprising 98°C for 20 seconds, 62°C for 2 seconds, and 74°C for 90 seconds were conducted. The PCR was conducted by using DNA Thermal Cycler PJ2000 (manufactured by Perkin Elmer). 5  $\mu$ l of the reaction solution was subjected to agarose gel electrophoresis, and stained with ethidium bromide. The electropherogram is shown in FIG. 2.

[0035]

In FIG. 2, lanes 1 and 8 show the pattern for size marker comprising Hind III digestion product of  $\lambda$  phage DNA, and lanes 2 and 3 show the electrophoretic pattern for the PCR amplification product of the DNA extracted and purified by the method described in Example 1. The desired amplification fragment of about 1.3 kb was obtained to confirm that the chloroplast DNA could be successfully extracted and purified, and that the purified extract DNA could be used in the PCR with no additional treatment.

[0036]

#### Reference Example 2

PCR was conducted by using *rbcL*-MT (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit N-methyltransferase gene, present on nuclear genome) for the target as an attempt to detect DNA in the nucleus of purified extract (of

the present invention) obtained in Example 1. 2 sets of primers were designed such that the amplified fragment respectively had a size of (1) about 2.2 kb and (2) about 4.6 kb. PCR was conducted by using KOD Dash DNA polymerase (manufactured by Toyobo). 100 ng of the DNA extracted and purified in Example 1 was used for the temperate. The PCR was conducted for the total volume of 100  $\mu$ l, and after the hot start at 94°C for 1 minute, (1) 30 cycles of 98°C for 20 seconds, 65°C for 2 seconds, and 74°C for 2 minutes for the 2.2 kb fragment, and (2) 35 cycles of 98°C for 20 seconds, 66°C for 2 seconds, and 74°C for 4 minutes for the 4.6 kb were conducted. The PCR was conducted by using DNA Thermal Cycler PJ2000 (manufactured by Perkin Elmer). [0037]

Of the reaction solution, 7  $\mu$ l was subjected to agarose gel electrophoresis, and stained with ethidium bromide. The electropherogram is shown in FIG. 2. In FIG. 2, lanes 1 and 8 show the pattern for size marker comprising Hind III digestion product of  $\lambda$  phage DNA, lanes 4 and 5 show the pattern for the PCR amplification product of 2.2 kb of the DNA extracted and purified by the method described in Example 1, and lanes 6 and 7 show the pattern for the PCR amplification product of 4.6 kb of the DNA extracted and purified by the method described in Example 1. The desired amplification fragments of about 2.2 kb, and about 4.6 kb were respectively obtained to confirm that the nuclear DNA could be successfully extracted, and that the extracted DNA could be used in the PCR, and also in the long PCR, with no additional treatment. [0038]

## Example 2

### Extraction of DNA from tobacco green leaves

The sample used for the nucleic acid extraction was tobacco green leaves, and the DNA extraction was compared as in the case of Example 1 by using two lysis solutions, namely, (i) the solution containing the CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) and guanidine chloride as described below (the present invention), and (ii) the solution containing only the guanidine chloride (prior art method). [0039]

The lysis solutions used were:

[the present invention]

3% CTAB

3M guanidine chloride

1.5M sodium chloride

100mM Tris - HCl buffer (pH 7.9)

20mM EDTA (pH 8.0)

[prior art method]

7M guanidine chloride

50mM Tris - HCl buffer (pH 7.5)

[0040]

The extraction and purification were conducted for each solution at  $n = 2$ , and 5  $\mu$ l of the purified extract was subjected to agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. The electropherogram is shown in FIG. 3, in which lane 1 shows the pattern for the size marker comprising Hind III digestion product of  $\lambda$  phage DNA; lanes 2 and 3 show the pattern for the extract obtained by the method of the present invention; and lanes 4 and 5 shows the pattern for the extract obtained by the extraction using a solution containing only the chaotropic substance (prior art method). FIG. 3 confirmed the remarkably improved yield of the purified extract obtained by the method of the present invention compared to the purified extract obtained by the prior art method.

[0041]

[Merits of the Invention] The present invention is capable of collecting, extracting, and purifying a plant DNA by using a lysis solution containing a surfactant and an optional protein denaturant; removing the surfactant; using an adsorbing solution containing a chaotropic substance and a nucleic acid-adsorbing solid phase to specifically adsorb the DNA in the plant material onto on the solid phase; and using an elution solution and removing saccharides and proteins with a washing solution. This method can be conducted in a convenient manner with no need for the complex post treatment processing. In addition, the present invention solves the problem of insufficient cell lysis by the solution containing a chaotropic substance due to the presence of the rigid cell wall of the plant cell constituted primarily by cellulose and the problem of inhibition of the DNA adsorption onto the nucleic acid-adsorbing solid carrier due to the presence of secondary metabolites of the polysaccharide, the polyphenol, and the like abundantly contained in the plant cell.

[Brief Description of the Drawings]

[FIG. 1] FIG. 1 is a photograph presented as a substitute for the drawing to show the pattern of the agarose gel electrophoresis for the DNA extracted and purified from tobacco green leaves by the method of the present invention or the prior art method.

[FIG. 2] FIG. 2 is a photograph presented as a substitute for the drawing to show the pattern of the agarose gel electrophoresis for the PCR amplification products of the chloroplast DNA and the nucleic DNA extracted and purified from tobacco green leaves by the method of the present invention.

[FIG. 3] FIG. 3 is a photograph presented as a substitute for the drawing to show the pattern of the agarose gel electrophoresis for the DNA extracted and purified from tobacco green leaves by the method of the present invention or the prior art method.

FIG. 1

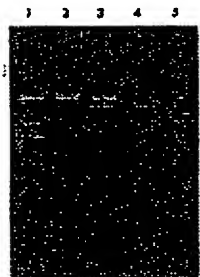


FIG. 2

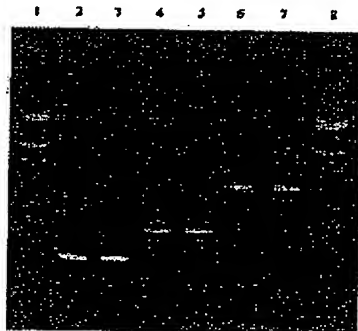


FIG. 3

